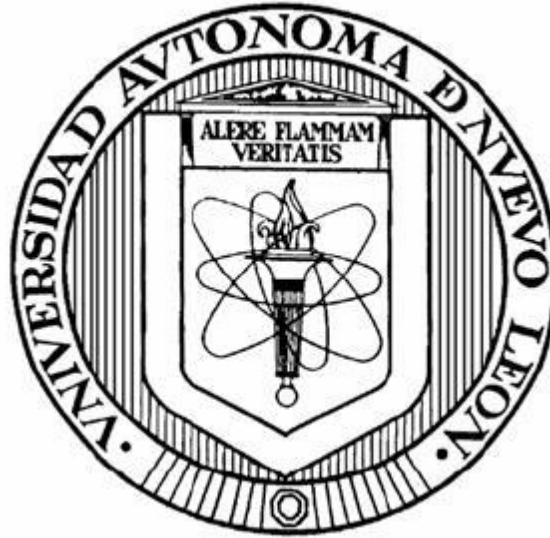


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TERAPIA ALTERNATIVA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CARGADAS  
CON  
EXOSOMAS DERIVADOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE**

**POR**

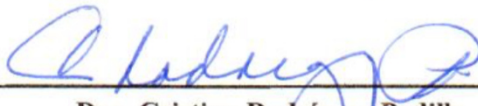
**YAREELLYS RAMOS ZAYAS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**


**MAYO, 2018**

**TERAPIA ALTERNATIVA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CARGADAS CON  
EXOSOMAS DERIVADOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE**

**Comité de Tesis**



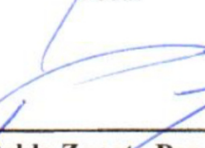
**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
Presidente



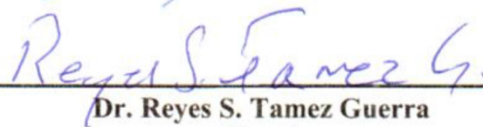
**Dr. Moisés A. Franco Molina**  
Secretario



**Dra. Diana G. Zarate Triviño**  
Vocal



**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
Vocal



**Dr. Reyes S. Tamez Guerra**  
Vocal

# ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.2 Tumor venéreo transmisible.....	3
2.2.1 Etiología.....	4
2.2.2 Aspectos clínicos e histológicos.....	4
2.2.3 Diagnóstico.....	5
2.2.4 Tratamientos.....	5
2.2.5 Inmunología del tumor venéreo transmisible.....	5
2.3 Inmunoterapia.....	6
2.4 Células dendríticas.....	8
2.5 Antígenos más utilizados en vacunas de células dendríticas.....	9
2.5.1 Proteínas.....	10
2.5.2 Péptidos.....	10
2.5.3 Lisados tumorales.....	10

2.5.4 Nueva fuente de antígenos, exosomas.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general.....	14
5.2 Objetivos particulares.....	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 Modelo animal.....	15
6.2 Aislamiento y cultivo de las células del tumor venéreo transmisible.....	15
6.3 Aislamiento de exosomas del cultivo celular de células de TVTC.....	15
6.4 Caracterización de exosomas.....	15
6.5 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y diferenciación a células dendríticas.....	15
6.6 Análisis fenotípico de las células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica.....	16
6.7 Ensayo de fagocitosis de células dendríticas inmaduras obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica.....	17
6.8 Preparación de la vacuna de células dendríticas autólogas cargadas con exosomas de células de tumor venéreo transmisible.....	17
6.9 Aplicación de la vacuna con células dendríticas específicas para el tumor venéreo transmisible.....	18
6.10 Evaluación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas cargadas con exosomas de TVT, sus efectos secundarios y tamaño tumoral.....	18
6.11 Análisis de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica.....	18
6.12 Determinación de los niveles de IFN- $\gamma$ en el suero sanguíneo por ELISA.....	18

6.13	Análisis estadístico.....	19
7.	RESULTADOS.....	20
7.1	Biopsias e histopatología de TVTC.....	20
7.2	Caracterización de los ETVTC.....	20
7.3	Efecto de los ETVTC como antígeno preventivo.....	21
7.4	Diferenciación de monocitos a células dendríticas.....	21
7.5	Efecto antitumoral de la terapia de células dendríticas cargadas con ETVTC.....	23
7.6	Evaluación de la población de linfocitos.....	24
7.7	Producción INF- $\gamma$ .....	24
8.	DISCUSION.....	25
9.	CONCLUSIONES.....	28
10.	PERSPECTIVAS.....	29
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	30
12.	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	34
13.	ANEXO.....	37

## **AGRADECIMIENTOS**

*Este trabajo de investigación se llevó acabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología.*

## AGRADECIMIENTOS

### ***A mi Familia***

*A mi ángel que me cuida y protege desde el cielo, mi mamá Wanda Zayas López, la mujer que me enseñó que todo en la vida es posible, solo tienes que luchar por ello y creer en ti. Las cosas más simples y valiosas de la vida son las más sencillas. A mi papá, Armando Ramos Negrón, el hombre más importante en mi vida, mi mejor amigo y mi ejemplo a seguir, el que ha estado a mi lado en cada paso de mi vida dándome lo mejor de él en todo momento. A ti Yannerys, por ser mi amiga, confidente, por siempre creer en mí y por darme el regalo más lindo que me han dado en la vida, Zoé. Gracias por ser siempre mi apoyo incondicional, porque en momentos de grandes decisiones han estado a mi lado y han confiado siempre en mí. Los amo con todo mi corazón, besitos y abrazos.*

### ***A mis Tías y Primos***

*Tití Wilma, Tití Cuca, TitíTati, Tío Luis, Coralys, Wanda, Luis A., José M., Lee Marie, Arnaldo, Leslie, gracias por todo su amor y por siempre estar para mí cuando más los he necesitado, por que la distancia no los ha alejado de mí, al contrario, los amo mucho, besitos y abrazos.*

### ***A ti Nelson y a tu Hermosa Familia***

*Nelson gracias por tu apoyo a cada momento en las buenas y en las malas, por ser mi amigo y mi pareja, al cual admiro con todo mi corazón, por hacerme reír y enseñarme tantas cosas de la vida. A Mamá Charo y Papá Rubén desde el cielo por quererme como una hija más, por su amor, sus comiditas y por brindarme un hogar único. A ti Charo, Claudia, Jorge y Lothar, por su amistad, por su amor, por siempre preguntar cómo iba mi trabajo, por sus buenos deseos, por su apoyo, por sus porras y por brindarme una familia la cual siempre llevaré en mi corazón, los amo mucho, besitos y abrazos.*

### ***A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla***

*Jefa del Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, directora de tesis de este trabajo, le agradezco todo su apoyo incondicional y confianza, por sus consejos, sus conocimientos, su cariño, su tiempo, por ser una mujer admirable en todas las facetas de la vida y por sus abrazos de fortaleza, besitos y abrazos, que papito Dios me la cuide y bendiga siempre con mucha salud y amor.*

### ***Al Dr. Moisés Armides Franco Molina (P<sup>2</sup>)***

*Por las vueltas que da la vida y tener el privilegio de que aquel que me hizo tantas preguntas en mi entrevista fuera con quien trabajaría en mi Tesis. Gracias AMIGO, por tu tiempo, tus conocimientos, tus consejos, tus bromas y por todo tu apoyo en las buenas y en las malas. Por abrirme las puertas de tu laboratorio, por la confianza que depositaste en mí desde el día en que llegué y que ha permanecido constante hasta el día de hoy, muchas gracias, te quiero y admiro mucho, besitos y abrazos.*

### ***A mi comité de Tesis***

*A la Dra. Diana G. Zarate, mi consejera, mi cómplice, mi ejemplo a seguir, gracias por tu linda amistad, por tu gran disposición y ayuda brindada durante el desarrollo de mi*

*proyecto y tus importantes observaciones, al Dr. Pablo Zapata Benavides, por su colaboración y apoyo en aspectos técnicos para el mejoramiento de mi trabajo y al Dr. Reyes Tamez Guerra por todo su apoyo, los quiero mucho, besitos y abrazos.*

***A mis Compañeros del Laboratorio 6 (el mejor del LIV) y el LIV***

*Erika, Carmen, Alex, Silvia, Luis Mario, Paola, Carlos, Kenia, a los doctores, profesores, intendentes, compañeros de los demás laboratorios, secretarias y todo personal de LIV. Gracias por su trato, por siempre tener una sonrisa para mí y por toda su ayuda, por su paciencia, por compartir sus conocimientos conmigo y siempre estar ahí para mí en las buenas y en las malas, con risas y con lágrimas y ser parte de mi Familia, los quiero mucho amigos, besitos y abrazos.*

***A mis Compañeros de Doctorado***

*Claudia, Mariela, Ashanti, Felipe y Alex, por su linda amistad y apoyo durante todo mi trabajo, por acogerme como una más de ustedes cuando recién entramos, son mi Familia, les deseo lo mejor siempre, uno para todos y todos para uno, los quiero mucho, besitos y abrazos.*

***A mi Segunda Familia Mexicana***

*Dayra, Adriana, Mafer, Yahmely, Hizelle, Zahela, Carlos, Diego, Ricky, Abraham, Wicho, Gera y César por tener el privilegio de conocerlos desde hace años y poder llamarlos Mi Familia, por ser mis colegas, mis amigos del alma, por siempre estar para mí en todo momento, por creer en mí y nunca dejarme sola, los amo con todo mi corazón, besitos y abrazos.*

***A mis Amigas del Alma***

*Lourdes, Giovana, Vimary y Nilsa, gracias porque a pesar de la distancia siempre hemos estado unidas. Gracias por todos estos años de amistad, sus detalles, por nunca dejarme sola y por todo su amor, las amo mucho, besitos y abrazos.*

***A CONACYT***

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios durante estos dos años.*



## DEDICATORIA

*Este trabajo se lo dedico a papito Dios y a la Virgencita, por ser los guías en mi vida y por mostrarme lo valioso de las cosas con pequeños detalles y demostrarme a cada paso que doy, que no estoy sola, porque ustedes están a mi lado.*

*A mi familia, las personas más importantes en mi vida y a las cuales amo con todo mi corazón y son mi razón de ser, las cuales día a día dan desinteresadamente lo mejor de ellos para impulsar mis sueños y ver cumplidas mis metas, que se desvelaron a mi lado, que se estresaron conmigo, que se preocuparon por mí, que con una llamada bastaba para que sintiera de nuevo la motivación de comenzar con mas ánimo el día siguiente, que el estar lejos de mi hogar nunca significó un desafío para su amor, cariño y su incondicionalidad, palabras siempre me faltan cuando tengo que agradecer al pilar de mi vida y la razón de mis triunfos...*

*Mi Hermosa Familia, esto es por Ustedes.*

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CONTENIDO

### PÁGINA

<b>Figura 1.</b> Biopsias de tumor venéreo transmisible canino e histopatología.....	20
<b>Figura 2.</b> Caracterización de los exosomas de tumor venéreo transmisible canino.....	21
<b>Figura 3.</b> Efecto de los exosomas de tumor venéreo transmisible canino como antígeno preventivo.....	21
<b>Figura 4.</b> Diferenciación de monocitos a células dendríticas.....	22
<b>Figura 5.</b> Captación de FITC-Dextran en células dendríticas inmaduras.....	22
<b>Figura 6.</b> Fenotipificación por citometría de flujo en células dendríticas.....	23
<b>Figura 7.</b> Efecto antitumoral de las células dendríticas cargadas con terapia de exosomas de tumor venéreo transmisible canino.....	23
<b>Figura 8.</b> Evaluación de la población de linfocitos.....	24
<b>Figura 9.</b> Producción de INF- $\gamma$ .....	24

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
C	Celsius
CD	Célula dendrítica
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cm	Centímetros
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	Célula presentadora de antígeno
DLA II	Antígeno leucocitario de perro II
DMEM	Medio dulbecco'seagle's modificado
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ETT	Extracto tumoral total
FEC	Factores estimulantes de colonias
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN- $\gamma$	Interferón-gamma
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IM	Intramuscular

IV	Intravenoso
kg	Kilogramos
KLH	Key-hole limpet hemocyanin
m <sup>2</sup>	Metros al cuadrado
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NK	Asesinas naturales
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RPMI	Medio Roswell park memorial institute
SC	Subcutáneo
SFB	Suero fetal bovino
TCR	Receptor linfocito T
TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
Th-1	Linfocito T cooperador tipo 1
Th-2	Linfocito T cooperador tipo 2
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TVT	Tumor venéreo transmisible
TVTC	Tumor venéreo transmisible canino
Tx	Tratamiento
U	Unidades
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ L	Microlitros

## RESUMEN

La inmunoterapia celular estimula y restaura las defensas naturales del sistema inmune para combatir el cáncer. Las células dendríticas (CD) son células especializadas del sistema inmune y su función es capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos para iniciar una respuesta inmune. Una nueva fuente de antígenos para las CD son los exosomas, pequeñas vesículas (30-120 nm) que contienen ARN, ADN y proteína. Se han identificado proteínas tales como tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), proteínas de choque térmico (Hsp), moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II y antígenos asociados a tumores (AAT). Un excelente modelo *in vivo* para estudios de inmunoterapia es el tumor venéreo transmisible canino (TVTC), uno de los cuatro tumores transmisibles en el mundo, es un cáncer transmisible en perros que afecta principalmente los genitales externos y se transmite durante el coito. En este trabajo utilizamos CD pulsadas con exosomas de TVTC como tratamiento en caninos con TVT. Para estudiar la inmunoterapia, se usaron tres grupos experimentales: grupo no vacunado; vacunados con exosomas de TVTC y vacunados con CD pulsadas con exosomas de TVTC. Para la inmunoterapia, se realizó un cultivo primario de células de TVTC, se aislaron los exosomas de TVTC y se caracterizaron por un ensayo de microscopía de transmisión electrónica, dot blot y cuantificación de proteínas. Luego se extrajo el 4% de sangre de los pacientes para diferenciar monocitos en CD. Para evaluar el efecto de la inmunoterapia con CD se observaron efectos secundarios, tamaño tumoral, poblaciones de linfocitos y los niveles de IFN- $\gamma$  en suero sanguíneo. Los exosomas aislados de TVTC mostraron una muestra homogénea con una forma circular de aproximadamente 90 nm. En el dot blot, todos los marcadores de proteína (CD81, CD63, CD9 y Hsp70) fueron positivos, excepto el control (albúmina). La cuantificación de proteínas de cinco muestras representativas de los exosomas fue de 9.15 mg/mL, 13.65 mg/mL, 10.21 mg/mL, 11.43 mg/mL y 10.79 mg/mL. Los monocitos se diferenciaron en CD y se sometieron a un análisis fenotípico mediante citometría de flujo. Los monocitos mostraron una expresión de 85.71% para CD14<sup>+</sup>, 12.3% para CD80<sup>+</sup>, 0.1% para CD83<sup>+</sup> y 0.8% para DLA II. Las CD mostraron 5.1% para CD14<sup>+</sup>, 86.7% para CD80<sup>+</sup>, 90.1% para CD83<sup>+</sup> y 92.6% para DLA II y un porcentaje de fagocitosis de 63% que se obtuvo mediante la prueba de FITC-Dextran. No se observó ningún efecto secundario en nuestro grupo experimental para nuestra terapia y la regresión tumoral fue del 100% durante la séptima semana. Un aumento de expresión en la población de CD4<sup>+</sup> de 28% y de 34% en la población de CD8<sup>+</sup> y los niveles de IFN- $\gamma$  aumentaron a 142 pg/mL. Estos resultados muestran que las CD pulsadas con exosomas tumorales inducen la regresión del TVT en perros.

## ABSTRACT

Cellular immunotherapy stimulates and restore the natural defenses of the immune system to fight cancer. The dendritic cells (DC) are specialized cells of the immune system and its role is to capture, process and present antigens to lymphocytes to initiate an immune response. A new source of antigens for DC are exosomes, small vesicles (30-120 nm) containing RNA, DNA and protein. Proteins such as tetraspanins (CD9, CD63, CD81), heat-shock protein (Hsp), major histocompatibility complex (MHC) class I and II molecules and tumor associated antigens (TAA) have been identified. An excellent *in vivo* model for immunotherapy studies is the canine transmissible venereal tumor (CTVT), one of the four transmissible tumors in the world, is a transmissible cancer in dogs that mostly affects the external genitalia and is transmitted during sexual coition. In this work we used DC pulsed with CTVT exosomes as treatment in canines with TVT. To study the immunotherapy three experimental groups were used: unvaccinated group; vaccinated with CTVT exosomes and vaccinated with DC pulsed with CTVT exosomes. For the immunotherapy a primary culture of CTVT cells was performed, CTVT exosomes were isolated and characterized by scanning electron microscopy assay, dot blot and protein quantification. Then was extracted 4% of their body weight of blood of the patients to differentiate monocytes into DC. To evaluate the effect of the immunotherapy with DC side effects were observed, also tumor size, populations of lymphocytes and IFN- $\gamma$  levels in blood serum. The CTVT isolated exosomes showed a homogeneous sample with a circular shape of approximately 90 nm. In the dot blot, all the protein markers CD81, CD63, CD9 and Hsp70 were positive except the control (albumin). The protein quantification of five representative samples of the exosomes were 9.15 mg/mL, 13.65 mg/mL, 10.21 mg/mL, 11.43 mg/mL and 10.79 mg/mL. Monocytes were differentiated into DC and underwent a phenotypic analysis by flow cytometry. Monocytes showed an expression of 85.71% for CD14<sup>+</sup>, 12.3% for CD80<sup>+</sup>, 0.1% for CD83<sup>+</sup> and 0.8% for DLA II. In DC 5.1% for CD14<sup>+</sup>, 86.7% for CD80<sup>+</sup>, 90.1% for CD83<sup>+</sup> and 92.6% for DLA II and a phagocytosis percent of 63% was obtained by FITC-Dextran test. No side effect was showed in our experimental group for our therapy and the tumor regression was of 100% for seventh week. An increase of 28% of CD4<sup>+</sup> and 34% of CD8<sup>+</sup> cell expression and IFN- $\gamma$  level of 142 pg/mL were found. These results shown that DC pulsed with tumor exosomes induce regression of the TVT in dogs.

# 1. INTRODUCCIÓN

El TVTC es un tumor clonalmente transmisible que puede transmitirse entre los perros a través del coito y es endémico de los cinco continentes. Se ha utilizado en la inmunoterapia del cáncer porque se puede trasplantar fácilmente a otros perros mediante inyección subcutánea o intra-órgano (Chien-ChunPai, 2011). Este modelo podría aumentar las implicaciones traslacionales para el estudio de tumores análogos en humanos y permitir examinar aspectos inmunológicos de la propagación del cáncer y la vigilancia del tumor (Iain D. O'Neill, 2011).

Diferentes células en nuestro cuerpo producen y liberan en su microambiente microvesículas (MV) o exosomas. Los exosomas son pequeñas vesículas (30-120 nm) que contienen ARN, ADN y proteínas, entre ellas, proteínas chaperonas como tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), proteínas de choque térmico (Hsp) 70, complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I y II, así como antígenos asociados a tumores (AAT), por ejemplo, Mart1, melan-A, gp-100, mesotelina, antígeno carcinoembrionario y Her2-neu(Mahaweniet *al.* 2013). Estos son secretados por varios tipos de células en cultivo celular y se encuentran en abundancia en fluidos corporales, como sangre, saliva, orina y leche materna, entre otros(Ninget *al.* 2011). Se piensa que los exosomas funcionan como mensajeros intercelulares, entregando su carga de moléculas efectoras o de señalización entre células específicas, sin embargo, su formación, la composición de la carga y las vías biológicas en las que están implicados no se conocen por completo(Shengminget *al.* 2008).

Debido a estas propiedades potenciales inmunogénicas, se han realizado estudios para utilizar a los exosomas tumorales como una fuente de antígenos para la inmunoterapia de CD en el mesotelioma, el melanoma, el carcinoma de células renales y el glioma(Young *et al.* 2007). El resultado de estos estudios fue alentador. Las CD cargadas con exosomas tumorales presentaron los antígenos cruzados a las células T citotóxicas, indujeron la diferenciación y la expansión de las células T citotóxicas específicas del tumor y activaron las respuestas antitumorales en estos tumores inmunogénicos(Rachel *et al.* 2017).

La importancia de usar CD como una herramienta para tratar el cáncer depende de su capacidad para activar las células T específicas del huésped contra los antígenos tumorales (Hongyu *et al.* 2017). A pesar del hecho de que se han identificado antígenos asociados a tumores o antígenos específicos de tumores para varios tumores, todavía es necesario desarrollar nuevas fuentes de antígenos para inducir una respuesta inmune activa, eficaz y prolongada. Un buen antígeno debe contener no solo proteínas, sino también otras moléculas que puedan inducir una potente respuesta inmune, como ARN, ADN y componentes celulares (Casper *et al.* 2017). En este trabajo utilizaremos la terapia alternativa de células dendríticas cargadas con exosomas derivados de tumor venéreo transmisible canino para ver su efecto en la respuesta inmune antitumoral.



## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Cáncer**

Los organismos vivos están compuestos por millones de células vivas. Las células normales crecen, se dividen formando nuevas células y mueren de manera ordenada. Durante los primeros años de vida de una persona, las células normales se dividen más rápidamente para permitir el crecimiento. Una vez que se llega a la edad adulta, la mayoría de las células sólo se dividen para remplazar las células desgastadas o las que están muriendo y para reparar lesiones.

El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada. Existen muchos tipos de cáncer, pero todos comienzan debido al crecimiento sin control de células anormales. En lugar de morir, las células cancerosas continúan creciendo y forman nuevas células anormales. Estas células pueden también invadir o propagarse hacia otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer. El hecho de que crezcan sin control e invadan otros tejidos es lo que hace que una célula sea cancerosa (Meza *et al.* 2006).

El proceso por el cual se produce el cáncer o carcinogénesis es causado por mutaciones (puntual, translocación, amplificación, delección, y ganancia o pérdida de un cromosoma completo) en el material genético de las células. Las células se transforman en células cancerosas debido a una alteración en el ADN (Meza *et al.* 2006). El ADN se encuentra en cada célula y dirige todas sus actividades. En una célula normal, cuando se altera el ADN, la célula repara el daño o muere. Por el contrario, en las células cancerosas el ADN dañado no se repara y la célula no muere como debería. En lugar de esto, esta célula persiste en producir más células que el cuerpo no necesita. Todas estas células nuevas tendrán el mismo ADN dañado que tuvo la primera célula. Las personas pueden heredar un ADN dañado, pero la mayoría de las alteraciones del ADN son causadas por errores que ocurren durante la reproducción de una célula normal o por algún otro factor del ambiente. Algunas veces, la causa del daño al ADN es algo obvio, como el fumar cigarrillos. No obstante, es frecuente que no se encuentre una causa clara. A nivel mundial el cáncer es la causa principal de muerte en los países desarrollados y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo. Las estimaciones para 2020 apuntan a 18.7 millones de casos de cáncer y 8.6 millones de muertes por cáncer en todo el mundo (Dingli y Nowak, 2006).

### **2.2 Tumor venéreo transmisible**

El tumor venéreo transmisible canino, también conocido como sarcoma infeccioso, granuloma venéreo, linfosarcoma transmisible, condiloma canino o tumor de Sticker, es un tumor retículo endotelial de los perros, que mayormente afecta los genitales externos. Se

transmite durante el coito. Ocurre en animales sexualmente maduros, pudiendo también afectar a lobos y coyotes. Este tumor posee entre 57 y 64 cromosomas en contraste con los 78 normales de la especie (Murchison 2009). El TVTC es una neoplasia común en zonas tropicales y subtropicales. El tumor transmisible y su fenotipo fue descrito en 1876 por Nowinsky, posteriormente se convirtió en un modelo popular para los biólogos del cáncer. Sin embargo, a pesar de 130 años de investigación del TVTC, muchas características de este cáncer transmisible siguen siendo poco conocidas (De La Sota *et al.* 2000).

### **2.2.1 Etiología**

Nowinsky demostró que el tumor podía ser trasplantado de un huésped susceptible a otro por inoculación de células tumorales. El hallazgo de inclusiones citoplasmáticas en las células tumorales hizo que esta neoplasia sea atribuida a un agente viral por algunos autores (De La Sota *et al.* 2000). La exfoliación y trasplante de células neoplásicas es la vía principal de transmisión en mucosa genital, nasal u oral, durante el apareamiento, mordedura, rascado o lamido de los genitales afectados. La implantación del tumor se ve facilitada por la presencia de cualquier lesión en la mucosa o por pérdida de su integridad (Claudio *et al.* 2006).

El tumor aparece 50 a 60 días después de la implantación. El TVTC puede crecer lentamente o ser rápidamente invasivo. Se ha demostrado que el sistema inmunológico del huésped tiene un papel importante inhibiendo el crecimiento del tumor y las metástasis. En perros jóvenes o con inmunidad suprimida, puede haber tendencia a las metástasis. No obstante, en general, las metástasis ocurren en menos de 5-17% de los casos (Mukaratirwaa y Gruys, 2003). Estas han sido descritas en tejido subcutáneo, piel, nódulos linfáticos, ojos, amígdalas, hígado, bazo, mucosa oral, hipófisis, peritoneo, cerebro y huesos. Las lesiones extragenitales pueden ocurrir solas o asociadas con la localización genital (Marchal 1997).

Se han hallado distintos tipos de células en las diferentes fases de crecimiento tumoral. En el caso de tumores en fase de crecimiento progresivo, las células son redondas y con microvellosidades, mientras que cuando están en la etapa de regresión las células presentan forma fusiforme (Pérez *et al.* 1998). Por otra parte, los tumores que están en fase de regresión tienen un elevado número de linfocitos T que segregan interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-6 (IL-6), sustancias implicadas en la regresión tumoral (Ya-Wen 2002).

### **2.2.2 Aspectos clínicos e histológicos**

Inicialmente se observan pequeños nódulos rosas o rojos, de 1-3 mm de diámetro siendo las lesiones superficialmente dermoepidérmicas o pedunculadas. Los nódulos múltiples se unen formando una gran red hemorrágica de aspecto parecido a una coliflor. Estas masas

pueden tener de 5 a 7 cm de diámetro, progresando a más profundidad en la mucosa, con lesiones subcutáneas multinodulares que pueden exceder los 10-15 cm. El examen citológico muestra células típicamente redondeadas a poliédricas, con un delgado citoplasma eosinofílico vacuolado y un núcleo redondo hipercromático con 1-2 nucléolos y un número moderado de figuras mitóticas (Pérez *et al.* 1998).

Mucho se ha aprendido sobre el comportamiento de crecimiento de las células de TVTC en estudios de trasplantaciones experimentales. Los tumores de TVTC trasplantados experimentalmente tienen 3 fases diferentes de crecimiento; progresiva, estable y regresiva. Por el contrario, el TVTC en la forma natural aun no se comprende del todo. Se ha identificado una fase inicial de progresión y una de estabilidad, pero la regresión espontánea no ha sido bien documentada por el momento. La metástasis es frecuentemente observada en la forma natural (Harmelinet *et al.* 2002).

### **2.2.3 Diagnóstico**

Los perros con localización genital tienen una descarga vulvar o prepucial hemorrágica. En los machos las lesiones usualmente se localizan cranealmente en el pene, mucosa prepucial o glande. En las perras el tumor tiene macroscópicamente un aspecto similar y puede localizarse en el vestíbulo y/o canal vaginal proyectándose a través de los labios vulvares y frecuentemente causando una deformación de la región perianal. La descarga puede a veces atraer machos y ser confundida por los dueños con el estro (Ramírez *et al.* 2010). El diagnóstico definitivo se logra por medio del examen físico, hallazgos citológicos de células exfoliadas obtenidas por medio de hisopados, raspados o improntas del tumor y biopsias de histopatología (Pérez *et al.* 1998).

### **2.2.4 Tratamientos**

Se utiliza cirugía y quimioterapia para el tratamiento del TVTC (Mukaratirwaa y Gruys, 2003). Sin embargo, el sulfato de vincristina es el tratamiento más efectivo y mejores resultados. La vincristina se indica semanalmente en dosis de 0.5-0.7 mg/m<sup>2</sup> de área de superficie del cuerpo o 0.025 mg/kg, intravenoso (IV). La involución de las lesiones es gradual, aunque particularmente significativa al comienzo del tratamiento. La remisión completa lleva de 3 a 8 inyecciones y ocurre en más del 90% de los casos tratados (De La Sota *et al.* 2000).

### **2.2.5 Inmunología del tumor venéreo transmisible**

Una característica del TVTC durante la fase progresiva es que no expresan antígenos de histocompatibilidad (CMH) de tipo I y II, aunque ha habido informes contradictorios que mencionan que, si hay expresión, pero en bajas concentraciones, las cuales no son detectadas por el sistema inmune. Curiosamente, durante la fase de regresión se

incrementan el número de células de TVTC que expresan antígenos de histocompatibilidad. La transición de la fase progresiva a la fase regresiva de TVTC puede ser provocada por la inducción de la expresión de los antígenos del CMH causada por un incremento en la producción de citoquinas por los LIT (Murchison 2009).

Ya-Wenet *al.* (2002) encontraron que las células de TVTC producen factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB-1) y demostraron que esta citocina inhibe la actividad de las células asesinas naturales (NK), así como la citotoxicidad de los linfocitos infiltrantes de tumor. Los efectos supresores de TGFB-1 sobre la actividad de las NK pueden ser contrarrestados por la citocinaproinflamatoria IL-6, que es secretada por los linfocitos infiltrantes de tumor (Murchison 2009).

En resumen, varios investigadores han propuesto este modelo de cómo el TVTC evade el sistema inmune de su huésped. En la fase progresiva del TVTC no se expresan antígenos del CMH en las células tumorales. Estas células a su vez secretan TGFB-1, una citocina que inhibe la actividad de las células NK, de las células presentadoras de antígenos y de los LIT. Una vez que se alcanza un nivel significativo de IL-6 (la cual es producida por los LIT) en el microambiente tumoral, hay un efecto represivo del TGFB-1 y los LIT comienzan la liberación de IFN- $\gamma$  e induzcan la expresión de los antígenos de histocompatibilidad en las células de TVTC, provocando una respuesta inmune y por ende la regresión tumoral(Murchison *et al.*, 2010 y Ya-Wenet *al.*, 2002).

### **2.3 Inmunoterapia**

La inmunoterapia ayuda a estimular las defensas naturales del organismo para eliminar células cancerígenas. Se utilizan diferentes tipos de células tales como: los LIT, linfocitos T citotóxicos, células asesinas activadas por linfocinas, exosomas y células dendríticas las cuales ayudan a mejorar, identificar o restaurar la función del sistema inmunológico (Emens y Jaffee 2007). La preparación de vacunas basadas en células dendríticas, la administración sistémica de citocinas, la terapia con anticuerpos monoclonales y la expresión de moléculas inmunoestimuladoras en las células del tumor mediante tecnología de transferencia génica o transferencia de proteínas, constituyen estrategias inmunoterapéuticas que desencadenan respuestas inmunes antitumorales eficaces (Sagrario y Paloma 2011).

El uso de la inmunoterapia depende de la inducción de una respuesta inmune antitumoral específica. Numerosos estudios han demostrado que tanto la inmunidad innata como la adquirida son capaces de reconocer muchos antígenos del tumor y desencadenar una respuesta antitumoral frente a tumores en desarrollo. Estas respuestas antitumorales son mediadas sobre todo por los linfocitos T, con poca participación de anticuerpos. Sin embargo, las células tumorales, pobremente inmunogénicas, escapan de la

inmunovigilancia haciendo al hospedero incapaz de producir una respuesta inmune adecuada, dirigida hacia la metástasis del tumor (Rescigno *et al.* 2007).

Hay cuatro tipos de inmunoterapia, estos son: interferones, interleucinas, anticuerpos monoclonales y vacunas (de manera preventiva o como tratamiento). Estos pueden utilizarse solos o combinados entre sí o bien junto con otros tratamientos contra el cáncer.

1. Los interferones son un grupo de tres proteínas liberadas por los leucocitos en respuesta a los microorganismos invasores, con la misión de mejorar la reacción del sistema inmunitario contra el cáncer (Emens y Jaffee 2007). El interferón alfa está aprobado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, como el melanoma y la leucemia mieloide crónica, pero se está estudiando su uso en otros cánceres (López *et al.* 2004). 2. Las interleucinas son proteínas que incrementan el crecimiento y la actividad de las células inmunes del organismo. Hasta ahora se han identificado más de diez interleucinas, pero la IL-2 está aprobada como tratamiento contra el cáncer, sobre todo en los cánceres renales y melanomas que han tenido metástasis a otras partes del cuerpo (Rosenblatt 2008). 3. Los anticuerpos monoclonales se crean en el laboratorio fusionando dos tipos distintos de células. Se diseñan para atacar regiones específicas de la superficie de las células denominadas antígenos. Los antígenos ayudan a que el organismo identifique las células que son extrañas, como gérmenes o células cancerosas, y estimulan una respuesta inmunitaria (McLaughlin 2001). Los anticuerpos monoclonales se muestran prometedores como tratamiento del cáncer y como instrumento diagnóstico. 4. Las vacunas ayudan a que el organismo reconozca las células cancerosas y active el sistema inmunitario para que las destruya, hay varios tipos de vacunas contra el cáncer (Sondei 1989). Algunas de estas son: a. vacunas con células cancerosas que han sido destruidas con radiación para que no puedan producir tumores nuevos, b. vacunas que contienen antígenos producidos en el laboratorio diseñados para unirse a las células cancerosas, c. vacunas celulares, con células dendríticas. Las vacunas contra el cáncer se utilizan para ayudar a que el organismo destruya las células tumorales o evite que reaparezcan (John y Joanne 2004).

Las vacunas con células cancerosas irradiadas permiten la inducción de una respuesta inmune más policlonal mediante la presentación de una amplia gama de antígenos tumorales (Havranek *et al.* 2002). Un ejemplo es el desarrollo de GVAX, una vacuna basada en células enteras y genéticamente dirigidas a secretar factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF). GVAX ha demostrado que disminuye los niveles séricos del antígeno prostático específico (PSA, serina proteasa que se sobreexpresa en las células de los acinos y túbulos de la glándula prostática tumoral) en algunos pacientes en ensayos clínicos de fase I y II (Kaminski *et al.* 2003). Sin embargo, en los ensayos clínicos de fase III, comparando la eficacia clínica de la inmunoterapia GVAX combinada con Docetaxel, con la combinación Docetaxel más Prednisona, se encontró que había una incidencia mayor de muertes en el grupo de GVAX que en el grupo control de Docetaxel

(Kaminski *et al.* 2003). Los estudios recientes de vacunas basadas en células tumorales constituyen la gran promesa para el tratamiento del cáncer (Ross DS, Steele G. 1984).

Las vacunas con células dendríticas han demostrado ser eficaces. El primer estudio clínico de una vacuna basada en células dendríticas fue descrito en 1996 para el linfoma de células B. Actualmente, las vacunas basadas en células dendríticas se están utilizando en ensayos clínicos para tratar el melanoma, el cáncer de mama, gliomas, el mieloma múltiple, el linfoma Hodgkin, la leucemia linfática, el adenocarcinoma prostático, el cáncer de pulmón y el hepatocarcinoma (Hayes *et al.* 2001). Los datos iniciales proporcionados por los estudios clínicos indican que la vacunación basada en estas células puede inducir protección frente al desarrollo del tumor. Las células dendríticas presentan una capacidad única de tomar y procesar antígenos, de movilizarse hacia tejidos linfoides secundarios y de activar tanto linfocitos T cooperadores como linfocitos T citotóxicos (Gerold *et al.* 2010). La preparación de las vacunas basadas en células dendríticas implica la carga de éstas con antígenos del tumor, péptidos antigénicos, ADN o ARN aislado de células tumorales. La identidad de los antígenos tumorales o los epítomos del péptido específicos del tumor siguen siendo desconocidos para la mayoría de los tumores. Por ello, los estudios recientes se han centrado en desarrollar métodos más eficaces para la liberación de los antígenos tumorales a las células dendríticas (Karolina Palucka y Jacques Banchereau. 2012).

## **2.4 Células dendríticas**

Las CD son células especializadas del sistema inmunológico y su función es el capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T y B para iniciar una respuesta inmune. Las CD expresan entre 10 y 100 veces más moléculas del CMH que los macrófagos y los linfocitos B. La eficaz activación de los linfocitos T ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ) por parte de las CD necesita de dos señales consecutivas. La primera señal es la presentación antigénica vía CMH tipo II y I de las CD con los receptores de las células T y la segunda señal es la interacción con moléculas co-estimuladoras presentes en las CD: CD80y CD83 con el receptor linfocitario CD28, y la familia TNF con los receptores linfocitarios (Young *et al.* 2007).

Tras su activación, los linfocitos T vírgenes sufren una expansión clonal y una diferenciación a células efectoras secretoras de citocinas y células memoria. El tipo de respuesta consiguiente de los linfocitos T depende de varios factores, como la concentración antigénica en la CD, la afinidad del TCR por el CMH, la duración de la interacción de la CD con el linfocito T, el estado de maduración de la CD, y el tipo de estímulo responsable de la maduración de la CD58. La supervivencia a largo plazo de los linfocitos T y su diferenciación a células de memoria y efectoras requiere la interacción con CD maduras. La activación inducida por CD inmaduras es de más corta duración (Granados y Delgado 2008).

Los linfocitos CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse hacia linfocitos Th-1, que producen IFN- $\gamma$  y secundan una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, o hacia linfocitos Th-2, que producen IL-4, IL-5 e IL-13, e implican inmunidad humoral y disminución de la respuesta Th-1. El patrón de citocinas producido por la CD activada determinará la dirección de esta polarización; IL-12, IL-18 e IL-27 dirigen hacia Th-1, mientras que CCL17, CCL22 o la ausencia de IL-12 lo hacen hacia Th-2. A su vez, este patrón de citocinas está regulado por factores como el subtipo de CD, la localización anatómica de la CD o el tipo de estímulo madurador. Estos parámetros también controlan otras características de la respuesta de los linfocitos T, como la inducción de tolerancia o la recirculación (homing) de los linfocitos T (Seton 2012).

La cooperación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el momento de la activación es necesaria para generar linfocitos T CD8<sup>+</sup> memoria. Se cree que esta interacción está mediada por la unión entre la molécula CD40 de la CD y su ligando en el linfocito CD4<sup>+</sup> activado. (Seton 2012). Además de su papel central en la activación de los linfocitos T, las CD interactúan directamente con células NK, células NKT y linfocitos B. Las CD maduras y CD inmaduras pueden activar e inducir la expansión de células NK por mecanismos no aclarados totalmente, aunque se han descrito algunas proteínas y factores solubles implicados. Las CD activadas también inducen directamente la proliferación de linfocitos B, el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos; estas acciones las pueden llevar a cabo tanto de forma linfocito T-dependiente como linfocito T-independiente (Granados y Delgado 2008).

La capacidad de las CD para generar respuestas antitumorales *in vivo* ha sido documentada en modelos animales y en estudios clínicos humanos. La mayoría de los ensayos implican el aislamiento de CD, seguido de la carga con antígenos tumorales y la posterior infusión de estas CD portadoras de antígenos. Se han descrito un elevado número de antígenos tumorales susceptibles de ser utilizados en protocolos de inmunoterapia (Karolina y Jacques 2012).

La exposición al antígeno puede hacerse siguiendo diferentes estrategias. La más frecuente es la incubación de las CD con péptidos derivados de proteínas tumorales restringidos por CMH y con epítopos definidos para la estimulación de linfocitos T, principalmente CD8<sup>+</sup>. Desde finales de la década de los 90 se han hecho ensayos utilizando péptidos derivados de antígenos tumorales como MART-1, MAGE-1, gp100, CEA, PSMA o HER2/neu, por citar algunos (Gerold *et al.* 2003). Este sistema tiene las ventajas de evitar procesos autoinmunes y el no requerimiento de células o tejido tumoral. Sus principales inconvenientes son la necesidad de conocer los epítopos tumorales y la posibilidad de aplicarla únicamente a los pacientes cuyo HLA sea el adecuado. Para evitar los mecanismos de escape tumoral, es



frecuente el uso de varios péptidos simultáneamente, en lugar de un único péptido (Karolina y Jacques 2012).

## **2.5 Antígenos más utilizados en vacunas de células dendríticas**

Para lograr que las células dendríticas presenten un antígeno tumoral específico, estas pueden ser co-incubadas con células tumorales muertas, fragmentos de células tumorales, proteínas tumorales, ADN o ARN (ácido ribonucleico) tumoral, o con bacterias y virus que han sido manipulados a contener antígenos tumorales. Estas células tumorales o proteínas pueden ser del paciente que recibirá la vacuna, o de otro paciente con el mismo tipo de cáncer (Heiroet *al.* 2013).

### **2.5.1 Proteínas**

Estas funcionan para ayudar a las proteínas a doblarse a su forma correcta y previene que se doblen indebidamente en momentos de estrés. Las proteínas adquieren su nombre debido al hecho que se les encuentra en altos niveles en células que se mantienen a una temperatura mas alta de lo normal (por eso lo de choque térmico). La alta temperatura hace que las proteínas se doblen indebidamente, algo como cuando la alta temperatura en un sartén hace que la clara del huevo se torne blanca y se endurezca. Además de este papel, las proteínas de choque térmico pueden actuar como portadoras para los antígenos de proteínas de tumor (Heiroet *al.* 2013). Las células presentadoras de antígenos (CPA) sumamente especializadas, conocidas como células dendríticas, poseen receptores especiales para proteínas de choque térmico en su superficie (para identificar a las células enfermas). Si al paciente se le inyecta una combinación de proteína de tumor y proteína de choque térmico, las células dendríticas se unirán a la porción de la proteína de choque térmico de las proteínas unidas, y entonces le tomará y presentará las proteínas de tumor a las células T. Algunos ejemplos son: antígenos oncofetales, proteínas glicosiladas, citoqueratinas, anticuerpos séricos, CEA, alfafetoproteínas, HCG, MUC1, MUC16, filamentos intermedios y Her 2/Neu(Casper *et al.* 2017).

### **2.5.2 Péptidos**

Estos fragmentos protéicos derivados de un tumor tienen segmentos modificados que facilitan su presentación por parte de las células presentadoras de antígenos (CPA). Como los péptidos son específicos para el tumor, generan una respuesta inmunológica sumamente específica para el tumor (Salem 2014). El reto lo es, nuevamente, el identificar a una proteína específica para el tumor, de un tipo en particular de cáncer. Debido a las diferencias en nuestros genes, la manera en que el sistema inmunológico de diferentes personas ve a los antígenos no es necesariamente la misma. Esto significa que un péptido el cual es muy eficaz en generar una respuesta inmunológica en un individuo podría no funcionar para otro. Sin



embargo, la ventaja de esta estrategia es que estas vacunas son relativamente fáciles de manufacturar y de almacenar (Salem 2014).

### **2.5.3 Lisados tumorales**

Este enfoque gozó de popularidad por varios motivos: se extraen células del tumor presente en cada paciente individual (terapia individualizada), se las procesa y se las une a una sustancia (llamada "adyuvante") que estimula inespecíficamente la respuesta inmune (Xiaoyuet *al.* 2015). Este detalle no es menor, ya que los adyuvantes difieren en su toxicidad y efectividad para generar respuesta inmune. El problema con el enfoque individualizado es su dificultad para generalizarlo: si "cada paciente es un mundo", ¿cómo se extrapolan los resultados? Además, este enfoque es muy laborioso y de alto costo. No todos los tumores son igualmente aptos para preparar un "lisado" útil (Xiaoyuet *al.* 2015).

### **2.5.4 Nueva fuente de antígenos, exosomas**

Una vacuna ideal contra el cáncer debe ser capaz de estimular al sistema inmune para reconocer antígenos tumorales y montar una respuesta inmune apropiada hacia las células cancerosas sin causar daño a las células vecinas.

Los exosomas son nano-vesículas de 30 a 100 nm normalmente secretadas por todas las células normales y también por las células tumorales. Representan un sistema de transporte para un gran número de moléculas, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Los exosomas pueden ser usados como vectores de drogas o como moduladores del sistema inmune y poseen un gran potencial para el desarrollo de biofármacos para el cáncer (Casper *et al.* 2017). Son producidas por diversos tipos celulares, como los reticulocitos, células dendríticas, linfocitos B y T y células tumorales, entre otras. Se originan a partir de endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares y son liberados al espacio extracelular por fusión con la membrana plasmática. Se ha demostrado que los exosomas pueden estimular al sistema inmune de manera directa e indirecta (Hongyuet *al.* 2017).

Los exosomas derivados de células tumorales expresan diversas proteínas, incluyendo las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I, tetraspaninas o proteínas del shock térmico (PST) entre otras. Los derivados de células tumorales poseen como ventaja con respecto a la utilización de los extractos o células tumorales que son vesículas muy estables, fáciles de obtener, que pueden expresar moléculas propias y consecuentemente pueden constituir una mejor estrategia para el desarrollo de una vacuna anti-tumoral (Liu *et al.* 2018).

Se ha demostrado que los exosomas derivados de células tumorales promueven la inmunidad en modelos murinos, llevando a la erradicación de tumores por las células T CD8<sup>+</sup> y células T CD4<sup>+</sup>, como la supresión, así como directamente el crecimiento del tumor

y la resistencia al desarrollo de tumores malignos, esto dependiendo del estadio del tumor y del microambiente tumoral que se encuentre el paciente (Lee *et al.* 2012). Una mayor comprensión de estas áreas de la biología de los exosomas y especialmente de los mecanismos moleculares implicados en la orientación inmune celular, la interacción y la manipulación, es probable que proporcione una mejor aproximación al inmunoreconocimiento y la intervención terapéutica (Shahjahan *et al.* 2017).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a la gran cantidad de muertes anuales que causa el cáncer a nivel mundial y a que sus tratamientos hoy en día causan muchos efectos secundarios, las investigaciones se centran en buscar nuevos tratamientos para dicha enfermedad. Además de la cirugía, quimioterapia, radioterapia que son los tratamientos de primera opción para el cáncer se quiere implementar a la inmunoterapia como uno de primera opción. Al utilizar caninos como modelos de estudio en este trabajo, se espera obtener resultados y parámetros más similares al de los humanos para posibles usos en un futuro y poder establecer protocolos de inmunoterapia autóloga con células dendríticas.

#### **4. HIPÓTESIS**

La terapia alternativa de células dendríticas cargadas con exosomas derivados del tumor venéreo transmisible canino incrementa la respuesta inmune antitumoral.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Determinar la efectividad de la terapia alternativa de células dendríticas cargadas con exosomas derivados del tumor venéreo transmisible canino en la respuesta inmune antitumoral en un modelo canino.

### **5.2Objetivos particulares**

1. Aislar y cultivar células de tumor venéreo transmisible para obtener y caracterizar exosomas.
2. Evaluar la capacidad fagocítica de las células dendríticas inmaduras.
3. Evaluar la capacidad preventiva antitumoral de la inmunoterapia con células dendríticas cargadas con exosomas.
4. Evaluar la capacidad terapéutica antitumoral de la inmunoterapia con células dendríticas cargadas con exosomas.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Modelo animal**

Se utilizaron tres caninos hembras por cada grupo experimental, de raza mixta, de dos años aproximadamente y de talla mediana. Durante la investigación los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento, además de cumplir con la NOM-062-ZOO-1999, estar bajo la supervisión de un médico veterinario y con la aprobación del comité de ética de nuestra institución (CEIBA).

### **6.2 Aislamiento y cultivo de las células del tumor venéreo transmisible**

Las biopsias de TVTC se lavaron con PBS para quitar el exceso de sangre y se sometieron a una digestión mecánica automatizada (Becton Dickinson, Medimachine). Varias muestras de 10 mm<sup>3</sup> se depositaron en la cámara (Medicon) y se mezclaron cada una con 500 µL de solución PBS. Las muestras se corrieron por 30 segundos para ser disgregadas y luego se lavaron con PBS y se filtraron a través de una membrana Millipore de 70 µM. Se realizó un conteo celular de  $4 \times 10^{10}$  y se cultivaron en cajas de cultivo celular de 25 mL con medio DMEM, suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10%, antibiótico-antimicótico (Gibco), se incubaron a una temperatura de 37°C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.3 Aislamiento de exosomas del cultivo celular de células de TVT**

Una vez que se aislaron las células de TVTC se mantuvieron en cultivo por 48 horas y luego se les agregó el reactivo de aislamiento total de exosomas (Invitrogen), a 1 mL de medio celular se le añadieron 500 uL del reactivo y se incubaron toda la noche a 2°C a 8°C, luego de la incubación se centrifugaron las células a 10,000 rpm por 1 hora a 2°C a 8°C, se aspiró y se descartó el sobrenadante y los exosomas están en el fondo del tubo. Estos se resuspendieron en PBS al 1X y almacenaron hasta su uso.

### **6.4 Caracterización de exosomas**

Para la caracterización de los exosomas se realizaron tres métodos para corroborar su aislamiento. Primero se utilizó un microscopio de transmisión electrónica (MTE) para evaluar la morfología y el tamaño de los exosomas, segundo la técnica de dot blot para la detección de los anticuerpos característicos de los exosomas (CD9, CD63, CD81 y Hsp-70) y por último el NanoDrop para obtener la concentración de mg/mL.

### **6.5 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y diferenciación a células dendríticas**

Se colectó el 4% del peso corporal de sangre periférica de las hembras por medio de punción venosa yugular utilizando el dispositivo de aguja Safety-Lock de BD Vacutainer

en tubos al vacío heparinizados. Luego la sangre se colectó en tubos Falcon de 50 mL y se diluyó 1:1 con PBS. Se colocaron 20 mL de Ficoll-Hypaque en 2 tubos Falcon de 50 mL de fondo cónico con el uso de una pipeta de 10 mL. De manera muy cuidadosa, se tomaron 20 mL de la muestra de sangre y se vertieron despacio por la pared de cada uno de los tubos de 50 mL que contienen Ficoll-Hypaque, de tal forma que no se rompiera la fase entre los dos líquidos. Al terminar de verter la sangre, los tubos se centrifugaron a 400 g por 30 minutos a una temperatura de 25°C, asegurándonos de que el freno de la centrífuga estuviera desactivado.

Con la ayuda de una micropipeta de 1,000 µL y de forma muy cuidadosa, se colectó en un tubo de 15 mL de fondo cónico solamente la segunda capa que son las células mononucleares (linfocitos y monocitos). Una vez que se colectó la capa de células mononucleares, se sometieron a dos lavados utilizando PBS 1X estéril. Para el primer lavado, se le añadió un volumen de PBS 1X a los tubos de 15 mL que contenían las células mononucleares y se centrifugaron a 200 g por 20 minutos a 25°C. Transcurridos los 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se conservó el pellet celular. El pellet se resuspendió en 15 mL de PBS 1X y se centrifugó a 200 g por 10 min a 25°C. Transcurridos los 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%. Una vez que se determinó el número total de células obtenidas en la separación, se ajustó el número a  $2 \times 10^6$  células y se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos en un volumen final de mililitro de medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico (Gibco) por pozo.

Tras este periodo de incubación de 3 horas, se retiró el sobrenadante de las placas y se les agregó 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% a los pozos que tengan las células adherentes y estas se sometieron al proceso de estimulación y diferenciación de células dendríticas. Estos se estimularon con GM-CSF a una concentración de 1,000 U/mL e IL-4 a una concentración de 500 U/mL. Luego se les agregaron los exosomas de TVTC para su captación por las células dendríticas inmaduras en una concentración de 10 µg/mL por 2 horas, junto con el adyuvante key-hole limpet hemocyanin (KLH) en 20 µg/mL. Por último, se estimularon con IL-1β a una concentración de 10 ng/mL, TNF-α a una concentración de 1,000 U/mL, IL-6 a una concentración de 10 ng/mL y PGE<sub>2</sub> en una concentración 1 µM.

## **6.6 Análisis fenotípico de las células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica**

Luego de la incubación durante 48 horas con los estímulos de GM-CSF, IL-4, exosomas de TVT, KLH, IL-1β, TNF-α y PGE<sub>2</sub>, se retiró el sobrenadante de los pozos, se lavaron con PBS y se le aplicó a cada pozo 500 µL de tripsina (Gibco) y se incubaron por 3 minutos.

Pasado el tiempo se revisaron en el microscopio y se les agregó 500  $\mu$ L de medio RPMI 1640 con SFB al 10% para inactivar la tripsina. Luego se lavaron dos veces las células con PBS (1,200 rpm por 10 min), se ajustó la cantidad de células a  $1 \times 10^7$  y se resuspendió en 500  $\mu$ L de PBS en tubos de poliestireno de 1 mL. Se les añadió 5  $\mu$ L de los respectivos anticuerpos CD14, CD80, CD83 y DLA II a cada tubo por separado. Se incubaron por 30 minutos en hielo y en oscuridad. Tras la incubación con los anticuerpos, se les realizó un lavado con 1 mL de PBS 1X y se centrifugó a 1,200 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante para eliminar el exceso de anticuerpos y se resuspendió nuevamente el pellet en 500  $\mu$ L de PBS 1X para ser leídos en el citómetro de flujo. Como control negativo, se leyeron tres tubos con  $5 \times 10^5$  células sin ningún anticuerpo, con esto se determinarán las zonas de positividad y negatividad de los histogramas para los marcadores antes mencionados.

### **6.7 Ensayo de fagocitosis de células dendríticas inmaduras obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica**

La capacidad fagocítica de las CD inmaduras se probó mediante la capacidad de captación del reactivo FITC-Dextran (Sigma). Se utilizaron  $1 \times 10^8$  células para el ensayo y se cultivaron en 3 placas de 6 pozos con 1 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% (GIBCO). Todas las placas se incubaron por tres horas, la primera en presencia de 1 mg/mL de FITC-Dextran a 37 °C con un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Como controles, la segunda placa con la misma concentración de CD a diferencia que se incubó en medio RPMI 1640 sin FITC-Dextran por 3 horas a 37°C y la última placa con la misma concentración celular, pero se incubaron con 1 mg/mL de FITC-Dextran a 4°C. Después del tiempo de incubación, las células se sometieron a 3 lavados con PBS 1X frío suplementado con SFB al 1% para eliminar el exceso de FITC-Dextran que se encuentra en el medio o adherido inespecíficamente a la superficie de las células. Posterior a dos lavados, las células se resuspendieron en un volumen final de 500  $\mu$ L de PBS 1X y se analizaron por citometría de flujo (Accuri C6 Becton Dickinson).

### **6.8 Preparación de la vacuna de células dendríticas autólogas cargadas con exosomas de células de tumor venéreo transmisible canino**

Una vez que se comprobó la capacidad fagocítica de nuestras CD y transcurridas las horas de diferenciación de monocitos a CD se retiró el sobrenadante de las placas y se realizaron dos lavados con PBS para retirar algún restante del medio. Luego se le aplicó 500  $\mu$ L de tripsina, se esperó a que las células dendríticas se despegaran, aproximadamente 5 minutos y una vez corroborado en el microscopio que se despegaron se neutralizó la tripsina con medio RPMI 1640 con SFB al 10%. Se recolectaron las CD en un tubo Eppendorf de 50 mL y se le realizaron 3 lavados con PBS a 1,200 rpm por 10 minutos a 25°C. Luego se



ajustaron las células a  $1 \times 10^6$  y se resuspendieron con 1 mL de PBS y se recolectaron con una jeringa de 3 mL y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su aplicación.

#### **6.9 Aplicación de la vacuna con células dendríticas específicas para el tumor venéreo transmisible canino**

Una vez realizadas todas las pruebas de fenotipificación de las CD y medir su función de fagocitosis se comenzó con las terapias. Tres ciclos de inmunoterapia con CD autólogas específicas de los exosomas de TVTC ( $1 \times 10^6$ ) se aplicaron en intervalos de dos semanas por vía subcutánea cerca del nódulo linfático poplíteo y se realizó un periodo de observación de seis meses.

#### **6.10 Evaluación de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas cargadas con exosomas de TVTC, sus efectos secundarios y tamaño tumoral**

Una vez empezadas las inmunoterapias autólogas con las CD cargadas con exosomas de TVTC se observaron a las pacientes en varios criterios, su apetito, comportamiento, fiebre, náuseas, vómitos, escalofríos e hipersensibilidad. También se les realizó biometrías hemáticas y químicas sanguíneas cada dos semanas para ver algún efecto por los siguientes seis meses. Además, se evaluó el tamaño del tumor cada tercer día después de aplicar el tratamiento, el volumen del tumor (mm) se calculó utilizando la fórmula: longitud (mm) x anchura (mm) x altura (mm) x  $\pi/4$ .

#### **6.11 Análisis de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica**

Se realizó un análisis por citometría de flujo (Accuri C6 Becton Dickinson) con el propósito de evaluar las poblaciones de linfocitos T ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$  y  $CD8^+$ ), antes y después de la terapia autóloga (semana 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11). Se utilizó un kit comercial triple de anticuerpos monoclonales anti canino CD3-FITC, CD4-RPE, CD8-Alexa Fluor de Serotec, que fueron utilizados siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante.

#### **6.12 Determinación de los niveles de IFN- $\gamma$ en el suero sanguíneo por ELISA**

Para evaluar la función de las células dendríticas en activar a los linfocitos T se realizó una prueba para medir los niveles de IFN- $\gamma$  del suero de los pacientes que se les aplicó la inmunoterapia. El análisis se llevó a cabo en la semana 0, 1, 3, 5, 7, 9 y 11, mediante un ELISA sándwich en fase sólida. El nivel de IFN- $\gamma$  se determinó mediante el uso de un kit comercial, ELIPACK de R&D System, específico para IFN- $\gamma$  canino, con una sensibilidad de 60 pg/mL, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se les agregó 50  $\mu$ L del diluyente a cada pozo, luego se agregó 50  $\mu$ L de suero canino a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se lavaron 5 veces y se agregó 100  $\mu$ L del conjugado a cada pozo y se cubrió con un nuevo sellador de placas incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se aspiró y se lavó 5 veces, se

agregaron 100  $\mu$ L de Streptavidina a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se volvió a aspirar y se lavaron 5 veces más. Se añadió 100  $\mu$ L de la solución de sustrato a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos protegiendo de la luz. Por último, se agregó la solución de stop a cada pozo. Los niveles de IFN- $\gamma$  se analizaron en un lector de 450 nm inmediatamente (Hsiao *et al.*, 2008).

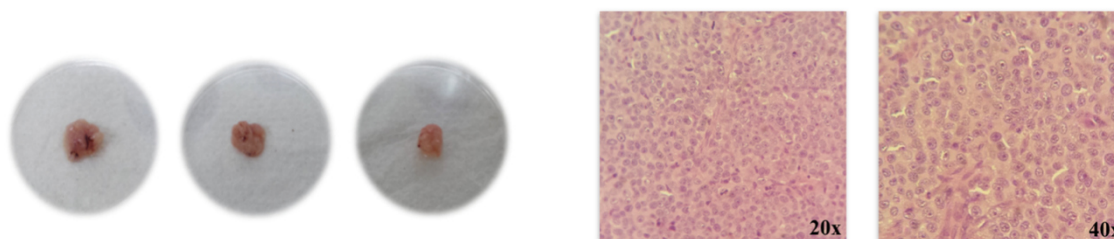
### **6.13 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico, todos los cálculos se realizaron con el programa Statgraphics (Centurion XVI). Se realizaron intervalos de confianza de un 95%, un análisis de la varianza por ANOVA y una comparación de medias mediante T-Student. Las pruebas se realizaron por triplicado y se consideró significativo a un valor con  $p < 0.05$  (\*).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Biopsias e histopatología de TVTC

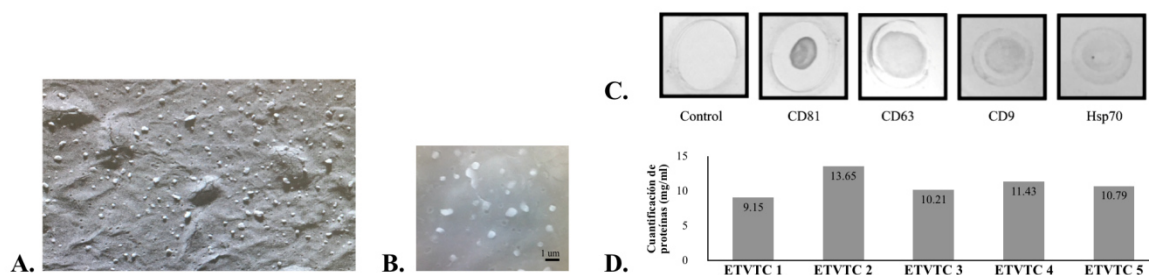
Las biopsias tumorales se colectaron quirúrgicamente (0.5 x 0.5 x 0.5 cm), las pacientes presentaban características clínicas típicas de TVTC, mostrando vulva deforme y rígida a la palpación con masas multinodulares en forma de coliflor. El análisis histopatológico de las biopsias mostró grupos o cordones apretados, compuestos por células homogéneas grandes y redondas e intercaladas por un delicado estroma. Las células tenían un citoplasma eosinofílico denso y en ocasiones vacuolado con núcleos grandes con anisocitosis y cromatina condensada o granular y nucléolos prominentes. Se observaron abundantes formas mitóticas, con grandes áreas de hemorragia y células picnóticas (**Figura 1**).



**Figura 1. Biopsias TVTC e histopatología.** A. La biopsia tumoral se recolectó quirúrgicamente (0.5x0.5x0.5cm) de diferentes perros hembras mixtas, con características clínicas típicas de TVTC, mostrando vulva deformada y turgente a la palpación con masas multinodulares de coliflor. B. La histopatología de las células TVTC muestra células redondas grandes que se distribuyen en grupos con abundantes formas mitóticas (2-4/40X). Los núcleos y nucléolos son prominentes. Se tiñe con hematoxilina y eosina.

### 7.2 Caracterización de los ETVTC

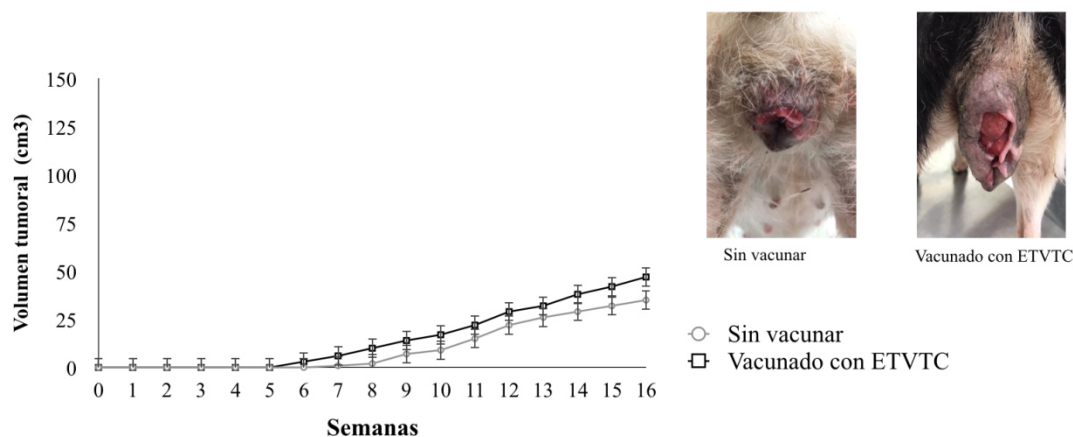
Para la caracterización de los exosomas de TVTC se realizaron las técnicas de microscopía de transmisión electrónica, dot blot y cuantificación de proteínas por NanoDrop. En la microscopía de transmisión electrónica de los ETVTC aislados mostraron una morfología homogénea con una forma circular de aproximadamente 90-100 nm de diámetro. En el dot blot, todos los marcadores de proteína CD81, CD63, CD9 y Hsp70 de ETVTC fueron positivos, excepto el control (albúmina). La cuantificación de proteínas de cinco muestras representativas de ETVTC fueron de 9.15 mg/mL, 13.65 mg/mL, 10.21 mg/mL, 11.43 mg/mL y 10.79 mg/mL. Estos resultados sugieren que si son exosomas las microvesículas obtenidas (**Figura 2**).



**Figura 2. Caracterización de ETVTC.** A. Análisis de microscopía de transmisión electrónica de losETVTC aislados. Los datos fueron representativos de ETVTC de un paciente. B. Zoom del ETVTC, barra = 100 nm. C. Ensayo de transferencia puntual de los marcadores de proteína CD81, CD63, CD9, Hsp70 y albumina como control negativo, todos los marcadores fueron positivos, excepto el control. D. Cuantificación de proteínas por Nanodrop de cinco muestras representativas de ETVTC.

### 7.3 Efecto de los ETVTC como antígeno preventivo

Tratando de utilizar los componentes de los exosomas como una fuente de antígeno preventivo en perros sanos se realizó un esquema de vacunación. No hubo diferencias entre el grupo vacunado con ETVTC y el grupo no vacunado. En ambos, el tumor creció progresivamente 47 cm<sup>3</sup> y 35 cm<sup>3</sup>, respectivamente (**Figura 3**).

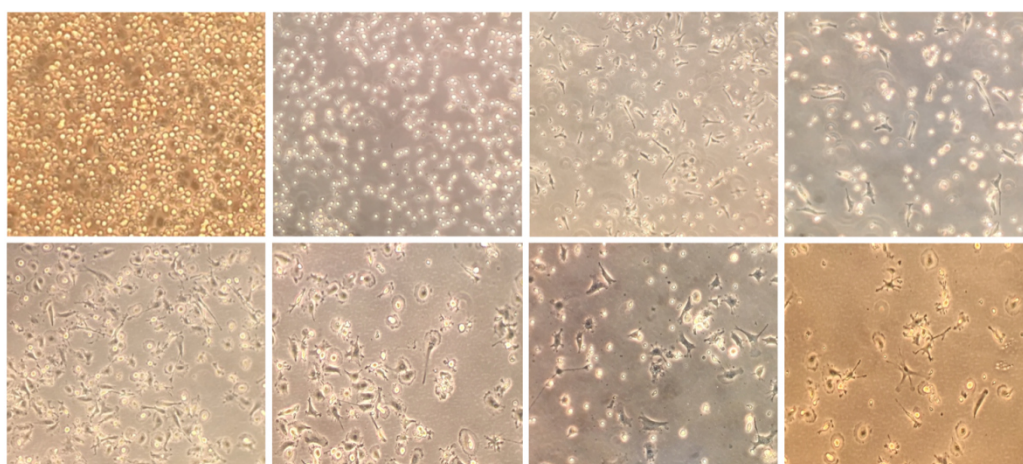


**Figura 3. Efecto de ETVTC como antígeno preventivo.** No hubo diferencia entre los tratamientos. En ambos, el tumor crece progresivamente.

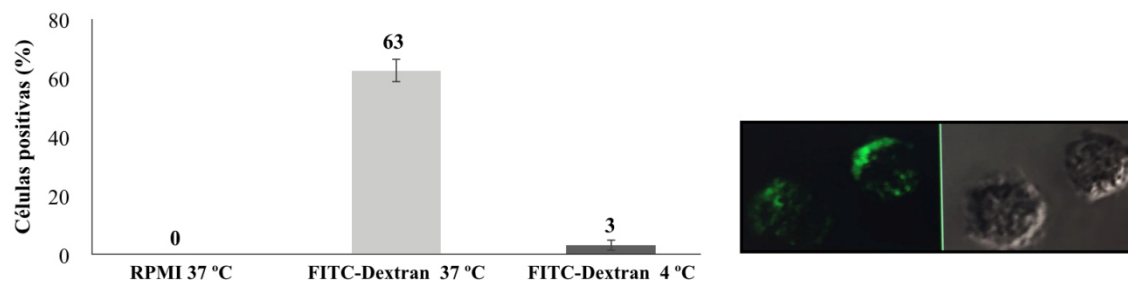
### 7.4 Diferenciación de monocitos de sangre periférica a células dendríticas

Los cambios morfológicos y de marcadores de superficie en los monocitos estimulados con citocinas y los ETVTC fueron notables y se obtuvieron CD en siete días. En los primeros días de cultivo de los monocitos mostraron una forma redonda con un color brillante y con el paso de los días cambiaron a células de color gris oscuro y con

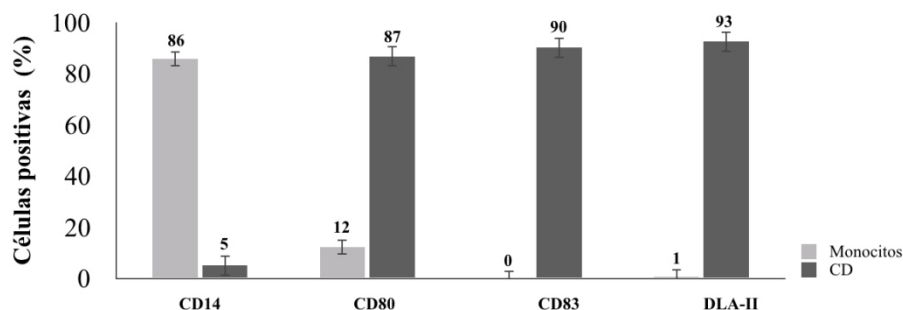
prolongaciones alargadas. La capacidad de la captación de FITC-Dextran de las células dendríticas inmaduras a 4 °C tuvo una captación menor (3.1%) que las células dendríticas inmaduras a 37 °C (62.5%), también se realizó una microscopía de fluorescencia para observar la fagocitosis, mostrando internalización del FITC-Dextran en las células dendríticas inmaduras. Los monocitos mostraron una expresión de los marcadores de superficie de CD14<sup>+</sup> de 85.7%, CD80<sup>+</sup> de 12.3%, CD83<sup>+</sup> de 0.1% y DLA II de 0.8% y cuando se trataron con el cóctel de citocinas y los ETVTC la expresión del marcador de superficie CD14<sup>+</sup> (5.1%) disminuyó considerablemente y CD80<sup>+</sup> (86.7%), CD83<sup>+</sup> (90.1%) y DLAII (92.6%) aumentaron su expresión (**Figura 4, 5 y 6**).



**Figura 4. Diferenciación de monocitos a células dendríticas.** Cambios morfológicos representativos en monocitos estimulados con citocinas y ETVTC para obtener CD de sangre periférica en siete días.



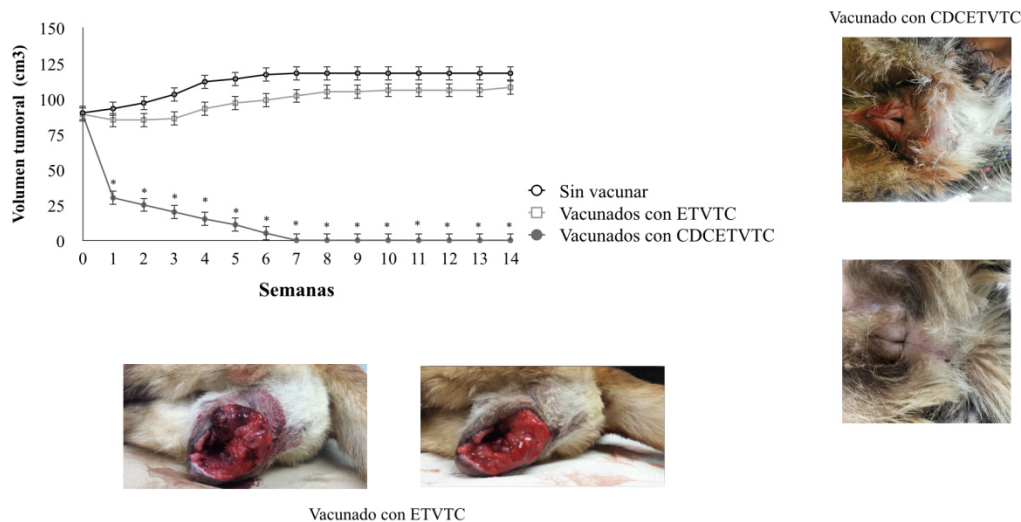
**Figura 5. Captación de FITC-Dextran en células dendríticas inmaduras.** La medición de la capacidad de captación de dextran que las células dendríticas inmaduras a 4 °C tenían una menor capacidad de captación (3.1%) que las células dendríticas inmaduras a 37 °C (62.5%).



**Figura 6. Fenotipificación por citometría de flujo en células dendríticas.** Los monocitos mostraron una expresión de los marcadores de superficie CD14<sup>+</sup> (85.7%), CD80<sup>+</sup> (12.3%), CD83<sup>+</sup> (0.1%) y DLA II (0.8%) y cuando se trataron con el cóctel de citoquinas la expresión de los marcadores de superficie disminuyó CD14<sup>+</sup> (5.1%) y CD80<sup>+</sup> (86.7%), CD8<sup>+</sup> (90.1%) y DLAII (92.6%) aumentaron la expresión.

## 7.5 Efecto antitumoral de la terapia de células dendríticas cargadas con ETVTC

Después del primer tratamiento con células dendríticas cargadas con exosomas de TVTC (CDETVTC) (en la primera semana), el tumor comenzó a involucionar (30 cm<sup>3</sup>) en comparación con los grupos controles (90 cm<sup>3</sup> los no vacunados y los vacunados con exosomas de TVTC (ETVTC) 89 cm<sup>3</sup>). En administraciones posteriores con células dendríticas cargadas con exosomas, la reducción tumoral fue progresiva en comparación con los controles que continuaron su crecimiento exponencial (en la cuarta semana los tratados con CDETVTC median 15 cm<sup>3</sup> y los controles 112 cm<sup>3</sup> y 93 cm<sup>3</sup>). Después de la última administración el tumor no fue visible y se eliminó en los pacientes tratados con células dendríticas cargadas con exosomas de TVTC, en comparación con los controles que continuaron creciendo hasta alcanzar aproximadamente 118 cm<sup>3</sup> y 108 cm<sup>3</sup> de diámetro a las 14 semanas (**Figura 7**).



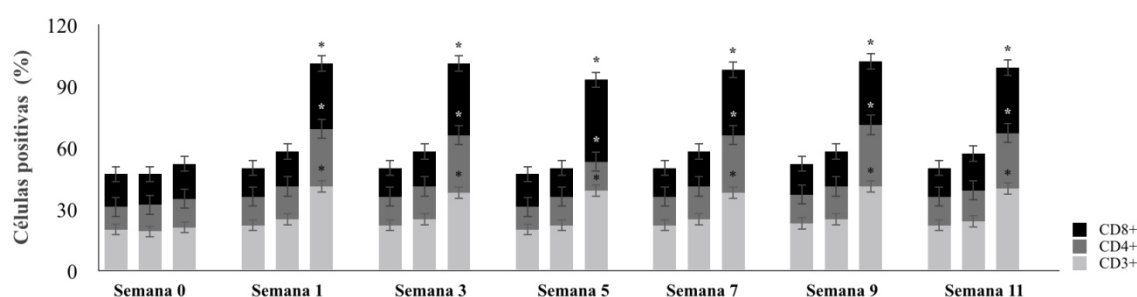
**Figura 7. Efecto antitumoral de las células dendríticas cargadas con terapia de exosomas de TVTC.** Después del primer tratamiento con células dendríticas cargadas con exosomas de TVTC, el tumor comenzó a involucionar en comparación con los animales de control. En las otras administraciones con células dendríticas cargadas de exosomas, la reducción del tumor fue progresiva en comparación con



los controles que continúan su crecimiento exponencial. Después de la última administración, el tumor no fue visible y se eliminó en comparación con los controles que continúan creciendo exponencialmente, hasta alcanzar 118 cm<sup>3</sup> de diámetro a las 14 semanas.

## 7.6 Evaluación de la población de linfocitos

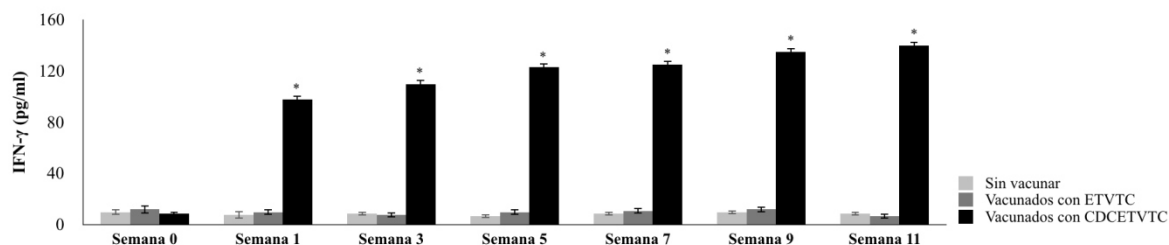
Después del primer y último ciclo de tratamientos, se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ) de las células dendríticas cargadas con exosomas de TVTC: CD8<sup>+</sup> (17%, 32%), CD4<sup>+</sup> (14%, 28%), CD3<sup>+</sup> (21%, 38%), los vacunados con ETVTC: CD8<sup>+</sup> (15%, 17%), CD4<sup>+</sup> (13%, 16%), CD3<sup>+</sup> (19%, 25%) y los no vacunados: CD8<sup>+</sup> (16%, 14%), CD4<sup>+</sup> (11%, 14%), CD3<sup>+</sup> (20%, 22%) respectivamente. El valor significativo  $p < 0.05$  con respecto al control (**Figura 8**).



**Figura 8. Evaluación de la población de linfocitos.** Después del primer y último ciclo de tratamientos, se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ) con células dendríticas cargadas con terapia con exosomas: CD8<sup>+</sup> (17%, 32%), CD4<sup>+</sup> (14%, 28%), CD3<sup>+</sup> (21%, 38%), vacunados con CTVTE: CD8<sup>+</sup> (15%, 17%), CD4<sup>+</sup> (13%, 16%), CD3<sup>+</sup> (19%, 25%) y no vacunados: CD8<sup>+</sup> (16%, 14%), CD4<sup>+</sup> (11%, 14%), CD3<sup>+</sup> (20%, 22%) respectivamente. Valor significativo  $p < 0.05$  con respecto al control.

## 7.7 Producción INF- $\gamma$

La terapia de células dendríticas cargadas con exosomas de TVTC aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) la producción de INF- $\gamma$ . Al comienzo del tratamiento, se encontraron niveles más bajos de producción de INF- $\gamma$  (10 pg/mL) pero se encontró un aumento en su producción desde la primera semana hasta la semana once (140 pg/mL). El grupo vacunado con ETVTC o el grupo no vacunado, no presentaron ninguna alteración en la producción de INF- $\gamma$  (12 y 10 pg/mL) cuando se compararon con las células dendríticas cargadas con los exosomas de TVTC (**Figura 9**).



**Figura 9. Producción de INF- $\gamma$ .** La terapia con células dendríticas aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) la producción de INF- $\gamma$ . Al comienzo del tratamiento, se encontraron niveles más bajos de producción de INF- $\gamma$  (10 pg/mL) pero se encontró un aumento en su producción desde la primera hasta la semana once (142 pg/mL). La terapia en donde fueron vacunados con ETVTC o los grupos no vacunados no afectaron la producción de INF- $\gamma$  (12 y 10 pg/mL) cuando se compararon con las células dendríticas cargadas con la terapia con ETVTC.



## 8. DISCUSIÓN

Tras el paso de los años uno de los grandes retos de la inmunoterapia celular con células dendríticas ha sido el buscar nuevas fuentes de antígenos que puedan realizar una fuerte y eficiente estimulación del sistema inmune y un buen modelo para aplicar y evaluar las terapias celulares. Buscando un modelo más similar a la genómica humana y con valores de referencia para la inmunoterapia más parecidos al humano, se decidió utilizar a la especie caninaya que, de igual manera, los perros desarrollan muchos tipos de cáncer similares a los humanos. En el presente estudio se determinó la efectividad de la inmunoterapia autóloga con células dendríticas cargadas con exosomas de tumor venéreo transmisible en un modelo canino.

Los exosomas secretados por las células tumorales son una excelente fuente de componentes celulares tales como alarminas (mRNA, tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), proteínas de choque térmico(HP-70), moléculas principales del complejo mayor de histocompatibilidad (clase I y II) y antígenos asociados a tumores, que estimulan la respuesta inmune (Mahaweniet *al.*, 2013). Por esta propiedad inmunogénica, los exosomas tumorales se han usado como una fuente de antígeno para estimular células dendríticas para la inmunoterapia en gliomas y otros tipos de cáncer (Ninget *al.*, 2011). El objetivo de este estudio fue demostrar el uso de exosomas derivados de TVTC como fuente de antígenos de células dendríticas y su administración en perros con TVTC como tratamiento contra dicha enfermedad. Primero, evaluamos la capacidad de los exosomas derivados de TVTC como una vacuna para prevenir el desarrollo de TVTC, pero los resultados no fueron satisfactorios, ya que no hubo ningún efecto preventivo. Probablemente se necesiten nuevas estrategias que impliquen modificaciones genéticas de las células productoras de exosomas para modificar el contenido de los exosomas, incluidas las citocinas o las moléculas que mejoran la inmunogenicidad inducida por los exosomas (Shengminget *al.*, 2008).

Las CD son consideradas como adyuvantes naturales por su capacidad potente como células presentadoras de antígenos, capaces de activar las respuestas inmunitarias tanto nativas como de memoria y expresar altos niveles de moléculas co-estimuladoras o co-inhibitorias que determinan la activación inmune o anergia (Rachel *et al.*, 2017).

Uno de los criterios para la evaluación de la inmunoterapia celular son los efectos secundarios: fiebre, escalofríos, náuseas, vómitos, inapetencia e hipersensibilidad. Ningún paciente del grupo experimental mostró efectos secundarios, como ya han reportado otros autores. Al evaluar el tamaño tumoral se observó como en los grupos controles el tumor creció hasta el final del estudio sin regresión alguna. A diferencia de otros autores como Chien y Chung, en donde hubo una regresión espontánea en el tumor cuando se inoculaba el tumor en el dorso de los perros. En el grupo tratado con CD autólogas cargadas con exosomas de TVTC hubo una regresión completa a la semana número 7 y con una significancia de  $p < 0.05$  comparado con los grupos controles.

También se evaluaron las poblaciones de linfocitos ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) en sangre periférica por citometría de flujo antes y después de la inmunoterapia, obteniendo un aumento significativo, lo que nos indica que si hubo un aumento en las poblaciones de linfocitos luego de la terapia con CD cargadas con exosomas de TVTC. Es decir que nuestras CD si pudieron activar a los linfocitos vírgenes en el nódulo linfático y estos infiltrarse a su vez en el tumor como lo reportado con Yang *et al.* 2009. Para evaluar que los linfocitos T fueron activados por las CD cargadas con exosomas decidimos determinar los niveles de IFN- $\gamma$  (pg/mL) en el suero de los pacientes antes y después de la terapia mediante la técnica de ELISA, de igual manera hubo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) comparado con los controles. De esta manera corroboramos que, si hubo una activación de los linfocitos citotóxicos, por la liberación del IFN- $\gamma$  en el suero de los pacientes tratados con CD cargadas con exosomas a diferencia de los grupos controles al igual que Chien *et al.* 2010.

Demostramos que los exosomas son antígenos eficientes y pueden inducir una respuesta inmune potente cuando se usan como antígeno para las CD. Además, las CD cargadas con exosomas tumorales son más eficientes que las CD cargadas con lisados tumorales, esto se basa en la captación altamente eficiente, el almacenamiento y presentación prolongada y el procesamiento de larga duración (Hongyu *et al.*, 2017). En conclusión, la inmunoterapia basada en CD pulsadas con exosomas de TVTC tiene el potencial de eliminar el TVTC.

Además, los exosomas derivados de TVTC ofrecen una fuente de antígeno específica optimizada para la terapia con CD. Pero más estudios sobre la eficacia deben llevarse a cabo en el tratamiento de este y otros tumores en la práctica clínica.

## 9. CONCLUSIONES

- Se estableció una línea celular de TVTC viables.
- Se logró aislar exosomas de células de TVTC como fuente de antígeno.
- Se diferenciaron monocitos de sangre periférica a CD autólogas *in vitro* específicas para TVTC cargadas con exosomas.
- Se implementó el modelo *in vivo* de la inmunoterapia autóloga con CD cargadas con exosomas específicas para caninos con TVT.
- La inmunoterapia autóloga con CD cargadas con exosomas no presentó ningún efecto secundario y hubo un incremento en la inmunidad celular.
- Los exosomas como terapia preventiva no previenen el crecimiento del TVTC.
- La inmunoterapia autóloga con CD cargadas con exosomas induce la regresión del tumor.

## **10. PERSPECTIVAS**

- Esta investigación deja la pauta para futuros trabajos que podrían enfocarse en evaluar más a fondo la activación de la inmunidad adaptativa y la inmunidad innata.
- El utilizar exosomas de las células tumorales como fuente de antígeno para la inmunoterapia con CD en otros tumores, ya que se ha demostrado su uso con resultados prometedores.
- Realizar la inmunoterapia en conjunto con los linfocitos CD8+ para ver si hay una disminución en el tumor a menor tiempo.
- El poder implementar esta terapia en humanos con diferentes tumores para evaluar la regresión tumoral.
- Identificar y caracterizar los antígenos tumorales del TVTC.

## 11. BIBLIOGRAFÍAS

1. Pai CC, Kuo TF, Mao SJT, et al. Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011; 139:187-99.
2. O'Neill ID. Concise review: transmissible animal tumors as models of the cancer stem-cell process. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2011; 29:1909-14.
3. Priscila DL, Ana CAA, José ESS, et al. Canine transmissible venereal tumor in the genital area with subcutaneous metastases in the head, case report. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias*. 2015; 110:120-123.
4. Shahjahan MSM, Erick TK, Emerich DF. Dendritic Cell-Based Cancer Therapies: Current Status and Future Directions. *Cell Therapy, Molecular and Translational Medicine*. 2017; 99-120.
5. Lee EY, Park KS, Yoon YJ, et al. Therapeutic Effects of Autologous Tumor-Derived Nanovesicles on Melanoma Growth and Metastasis. *PLoS ONE*. 2012; 7:1-12.
6. Heiro YD, Appel S. Current Status and Future Perspectives of Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2013; 78:167-171.
7. Casper JEW, Gözde G, Stefanie H, et al. Exosomes from antigen-pulsed dendritic cells induce stronger antigen-specific immune responses than microvesicles in vivo. *Scientific Reports*. 2017; 7:1-9.
8. Liu H, Chen L, Peng Y, et al. Dendritic cells loaded with tumor derived exosomes for cancer immunotherapy. *Oncotarget*. 2018; 9:2887-2894.

9. Rebecca EL, Darren K, Will A, et al. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Scientific Reports*. 2015; 5:1-7.
10. Mahaweni NM, Kaijen-Lambers MEH, Dekkers J, et al. Tumour-derived exosomes as antigen delivery carriers in dendritic cell-based immunotherapy for malignant mesothelioma. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013; 2:1-6.
11. Salem ML. The Use of Dendritic Cells for Peptide-Based Vaccination in Cancer Immunotherapy. *Cancer Vaccines: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2014; 479-503.
12. Ning B, Haiqin W, Bingzhong S, Guilian Z, et al. Exosome-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells in patients with glioma. *J Neurooncol*. 2011; 104:659-667.
13. Shengming D, Dong W, Zhen W, Xiangyang Z, et al. Phase I Clinical Trial of Autologous Ascites-derived Exosomes Combined With GM-CSF for Colorectal Cancer. *Molecular therapy*. 2008; 16:782-790.
14. Rachel LS, Sreekumar B, Nina B. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Research*. 2017; 27:74-95.
15. Hongyu L, Ling C, Jialin L, Hengxing M, et al. Co-delivery of tumor-derived exosomes with alpha-galactosylceramide on dendritic cell-based immunotherapy for glioblastoma. *Cancer Letters*. 2017; 411:182-190.
16. Das U, Das AK. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Res Commun*. 2000;24(8):545–56.

17. O'Neill ID. Concise review: transmissible animal tumors as models of the cancer stem-cell process. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2011;29(12):1909–14.
18. Pai C-C, Kuo T-F, Mao SJT, et al. Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;139(2–4):187–99.
19. Antonov A. Successful Treatment of Canine Transmissible Venereal Tumor Using Vincristine Sulfate. *Adv Res*. 2015;5(5):1–5.
20. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(5):411–22.
21. Chou P-C, Chuang T-F, Jan T-R, et al. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;130(1–2):25–34.
22. Bund D, Buhmann R, Gökmen F, et al. Canine-DCs using different serum-free methods as an approach to provide an animal-model for immunotherapeutic strategies. *Cell Immunol*. 2010;263(1):88–98.
23. Anguille S, Smits EL, Lion E, et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol*. 2014;15(7):e257-267.



24. Murchison EP, Wedge DC, Alexandrov LB, et al. Transmissible Dog Cancer Genome Reveals the Origin and History of an Ancient Cell Lineage. *Science*. 2014;343(6169):437–40.
25. Bürdek M, Spranger S, Wilde S, et al. Three-day dendritic cells for vaccine development: antigen uptake, processing and presentation. *J Transl Med*. 2010; 8:12-13.
26. Xu W, Liu H, Wang X, et al. Surfactin Induces Maturation of Dendritic Cells in vitro. *Biosci Rep*. 2016; 36 (5) e00387.
27. Weiss E-M, Wunderlich R, Ebel N, et al. Selected anti-tumor vaccines merit a place in multimodal tumor therapies. *Front Oncol*. 2012; 2:1-12.
28. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298–306.
29. Ishikawa T, Kokura S, Sakamoto N, et al. Whole blood interferon- $\gamma$  levels predict the therapeutic effects of adoptive T-cell therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2013;133(5):1119–25.

## 12. RESUMEN BIOGRÁFICO

**Yareellys Ramos Zayas**

Candidata para el Grado de  
**Doctor en Ciencias con Orientación en Immunobiología**

**Tesis: TERAPIA ALTERNATIVA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CARGADAS CON EXOSOMAS DERIVADOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE**

**Campo de Estudio:** Immunobiología del Cáncer

**Datos Personales:** Nacida en San Juan, Puerto Rico, el 26 de diciembre de 1979, hija de Wanda Zayas López y Armando Ramos Negrón.

**Educación:** Egresada de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Cayey, grado obtenido de Biólogo en 2004. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Médico Veterinario y Zootecnista en 2012, estudiante talento durante toda la licenciatura, con mención honorífica y mérito académico por primer lugar de generación 2007-2012. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Maestro en Ciencias con Orientación en Immunobiología en 2015, con mención honorífica.

**Experiencia Profesional:** Técnico Veterinario en Puerto Rico desde el 2003 al 2007, Asistente de Cirugía en la FMVZ, UANL desde el 2010 al 2012 y Médico Veterinario y Zootecnista en México desde el 2012.

### **Artículos:**

1. **Clinical trial evaluating the effectiveness of biocompound IMMUNEPOTENT CRP in the third-molar extraction.** Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2016. Moisés Armides Franco Molina, Edgar Mendoza Gamboa, Erika Evangelina Coronado Cerda, Diana Ginette Zarate Triviño, Juan E. Arizpe Coronado, Pablo Zapata Benavides, Yareellys Ramos Zayas, Reyes Tamez Guerra, Cristina Rodríguez Padilla.
2. **Autologous canine immunotherapy: short time generated dendritic cells loaded with canine transmissible venereal tumor-whole lysate.** Immunopharmacology & Immunotoxicology. 2018. Moisés Armides Franco Molina, Yareellys Ramos Zayas, Erika Evangelina Coronado Cerda, Edgar Mendoza Gamboa, Pablo Zapata Benavides, Silvia Elena Santana Krymskaya, Reyes Tamez Guerra, Cristina Rodríguez Padilla

3. **Immunotherapy for the treatment of canine transmissible venereal tumor based in dendritic cells pulsed with tumoral exosomes.**Immunopharmacology & Immunotoxicology. 2018. Yareellys Ramos Zayas, Moisés ArmidesFranco Molina, Alex Jesús Hernández Granados, Diana Ginette Zárate Triviño, Erika Evangelina Coronado Cerda, Edgar Mendoza Gamboa, Pablo Zapata Benavides, Rafael Ramírez Romero, Silvia Elena Santana Krymskaya, Reyes Tamez Guerra, Cristina Rodríguez Padilla.
4. **New approach based in immunotherapy treatment of transmissible venereal tumor.**XVII Congress of the Latin American Association of Immunology& XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology.2018. Yareellys Ramos Zayas, Moisés ArmidesFranco Molina, Diana Ginette Zárate Triviño, Pablo Zapata Benavides,Reyes Tamez Guerra, Cristina Rodríguez Padilla.
5. **Evaluation of a canine transmissible venereal tumor cell line with tumor immunity capacity but without tumorigenic property.**Journal of Veterinary Research. 2018. Yareellys Ramos Zayas, Moisés Armides Franco Molina, Reyes Tamez Guerra, Cristina Rodríguez Padilla (en revisión final).
6. **Immunogenic potential of three transmissible venereal tumor cell lysates to prime canine-dendritic cells for cancer immunotherapy.**Research in Veterinary Science. 2018. Alex Jesús Hernández Granados, Moisés Armides FrancoMolina, Erika Evangelina Coronado Cerda, Pablo Zapata Benavides, Edgar Mendoza Gamboa, Yareellys Ramos Zayas, Silvia Elena Santana Krímskaya, Cristina Rodríguez Padilla.
7. **Chitosan nanoparticles plus KLH adjuvant as an alternative for human dendritic cell differentiation.**Current Nanoscience. 2018. Moisés Armides Franco Molina, Erika Evangelina Coronado Cerda, Edgar López Pacheco, Diana Ginette Zarate Triviño, Sergio Arturo Galindo Rodríguez, María del Carmen Salazar Rodríguez, Yareellys Ramos Zayas, Reyes Tamez Guerra, Cristina Rodríguez Padilla.

#### **Reconocimientos:**

- Congreso Veterinario de León, Guanajuato. 2018. Primer lugar en modalidad Oral, con el trabajo: “Nuevo enfoque basado en la inmunoterapia celular como tratamiento para el tumor venéreo transmisibile”.
- XVII Congress of the Latin American Association of Immunology& XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology. 2018. Primer lugarenmodalidad Cartel, con el trabajo: “New approach based in immunotherapy treatment of transmissible venereal tumor”.

- Foro de Seminarios de Investigación Diciembre 2017, FCB, UANL, Nuevo León. 2017. Primer lugar modalidad Cartel, con el trabajo: “Terapia alternativa de células dendríticas cargadas con exosomas derivados de tumor venéreo transmisible”.
- 8<sup>vo</sup> Simposio Internacional de Inmunopatogénesis e Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas, Nuevo León. 2015. Congreso de Inmunoterapia. Segundo lugar en modalidad Cartel, con el trabajo: “Inmunoterapia autóloga con células dendríticas en caninos con tumor venéreo transmisible”.

#### **Cursos:**

- Congreso Veterinario de León, Ponente, Guanajuato, 2015, 2016, 2018.
- Simposio de Materiales Avanzados para Aplicaciones Biomédicas, Nuevo León, 2018.
- II Congreso de Inmuno-Oncología, Ciudad Obregón, 2017.
- Simposio de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes, Nuevo León, 2017.
- Aplicaciones del Cultivo Celular, Nuevo León, 2017.
- Protección de Patentes Biológicas, Nuevo León, 2016.
- Curso de Bioseguridad y Evaluación de Riesgos en Laboratorios, Nuevo León, 2015, 2016.
- 8<sup>vo</sup> Simposio Internacional de Inmunopatogénesis e Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas, Nuevo León. 2015.
- 11<sup>o</sup> Foro Internacional en SIDA, Enfermedades Emergente y Re-Emergentes, Nuevo León, 2015.
- I y II Curso Teórico-Práctico de Citometría de Flujo, Nuevo León I y II Congreso de Inmunoterapia, Nuevo León, 2015, 2016.
- 7<sup>o</sup> Simposio Internacional de Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas, Nuevo León, 2014.
- Simosio Internaciona VIH y VHC, Nuevo León, 2014.



**Immunotherapy for the treatment of canine transmissible venereal tumor based in dendritic cells pulsed with tumoral exosomes.**

Journal:	<i>Immunopharmacology And Immunotoxicology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ramos Zayas, Yareellys; UANL, Laboratorio de Inmunología y Virología Franco, Moisés; UANL, Microbiología e Inmunología Hernández Granados, Alex; UANL, Laboratorio de Inmunología y Virología Zárate Triviño, Diana; UANL, Laboratorio de Inmunología y Virología Coronado Cerda, Erika; Univerisdad Autonoma de Nuevo León, Laboratorio de Inmunología y Virología Mendoza-Gamboa, Edgar; Univerisdad Autonoma de Nuevo León, Microbiología e Inmunología Zapata Benavides, Pablo; Universidad Autonoma de Nuevo Leon Ramirez Romero, Rafael; Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Santana Krymskaya, Silvia; Univerisdad Autonoma de Nuevo León, Laboratorio de Inmunología y Virología Tamez Guerra, Reyes; Univerisdad Autonoma de Nuevo León, Laboratorio de Inmunología y Virología Rodríguez-Padilla, Cristina; Univerisdad Autonoma de Nuevo León, Microbiología e Inmunología
Keywords:	canine transmissible venereal tumor, tumor exosomes, dendritic cells, immunotherapy, autologous

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/lipi>